



GENTECHNIKBUCH: 3. KAPITEL

LISTE RISIKOBEWERTETER MIKROORGANISMEN FÜR ARBEITEN MIT GVO IM GESCHLOSSENEN SYSTEM – TEIL 2: ZELLINIEN

(beschlossen von der Gentechnikkommission am 20. November 2007)

1.) Allgemeines zur Risikobewertung von primären Zellen und Zellkulturen

1.1.) Begriffsbeschreibung:

Primäre Zellen: Direkt aus Körperflüssigkeiten oder aus Körpergeweben gewonnene Explantate von vielzelligen Organismen.

Primäre Zellkulturen: In Kultur genommene primäre Zellen bis zur ersten Passage.

1.2.) Risiko für Anwender:

Grundsätzlich besteht bei der Verwendung von etablierten, gut charakterisierten Zelllinien, von denen bekannt ist, dass sie keine Organismen einer höheren Risikogruppe abgeben, kein oder nur ein vernachlässigbares Risiko für den Anwender.

Bei der Verwendung von primären Zellen oder primären Zellkulturen höherer Organismen, kann jedoch eine mögliche Gefahr durch Kontaminationen mit humanpathogenen Viren ausgehen.

Besteht nun ein begründeter Verdacht, dass primäre Zellen oder primäre Zellkulturen übertragbare Krankheitserreger enthalten und abgeben können, ist vorsorglich zu prüfen, ob der Spender frei von Krankheitssymptomen und/oder serologisch negativ für bestimmte Viren ist, um die grundsätzliche Einstufung in Risikogruppe 1 für den Einzelfall beibehalten zu können.

Wenn nachgewiesen werden kann, dass die verwendeten Zellen und Zelllinien keine Organismen einer höheren Risikogruppe abgeben, können diese Zellen und Zelllinien als Spender- und Empfängerorganismen für Arbeiten mit GVO im geschlossenen System in die Risikogruppe 1 eingeordnet werden.

Enthalten sie Organismen einer höheren Risikogruppe, ist die Risikogruppe dieses Organismus voll in die Risikobewertung mit einzubeziehen.

Von primären Pflanzen- und Insektenzellen geht nach dem Stand der Wissenschaft keine Gefahr für die Beschäftigten aus. Diese Zellen und Zelllinien können somit in die Risikogruppe 1 eingeordnet werden.

1.3.) Risiko für die Umwelt:

Die Kultivierung von Zellen und Zellkulturen aus höheren Organismen erfordert die Verwendung aufwendiger Medien und spezieller Anzuchtbedingungen. Daher kann unter Betrachtung des § 1 Z 1 lit. b. des Gentechnikgesetzes (GTG) ein Risiko für die Umwelt durch Zellen und Zellkulturen ausgeschlossen werden, da diese ohne die aufwendigen Kulturbedingungen außerhalb des Labors nicht überlebensfähig sind.

1.4.) Risikobewertung von primären Vertebratenzellen:

Bei der Abschätzung des Gefährdungspotentials primärer Zellen ist es zweckmäßig, zwischen Mensch, anderen Primaten, *Chiroptera* (Flattertiere) und sonstigen Vertebraten zu unterscheiden.

1.4.1.) Humane Zellen:

Grundsätzliche Risikobewertung bei der Verwendung von primären Zellen des Menschen:

Wenn durch immunologische Tests die Seronegativität des Spenders für HIV, HBV und HCV nachgewiesen ist oder durch andere Verfahren gezeigt ist, dass die Zellen frei von diesen Viren sind, können primäre Zellen aus klinisch unauffälligen Spendern in die Risikogruppe 1 eingeordnet werden. Bei Vorliegen eines begründeten Verdachts auf das Vorhandensein eines bestimmten Virus einer höheren Risikogruppe ist das primäre Gewebe auf die Abwesenheit dieses Virus zu überprüfen, bevor eine Einstufung in die Risikogruppe 1 erfolgen kann.

Werden die Spender oder die Zellen vor der Verwendung nicht auf Abwesenheit der genannten Viren überprüft, so sind diese primären Zellen grundsätzlich der Risikogruppe 2, bei Verwendung als Spenderorganismen gegebenenfalls der Risikogruppe 1 zuzuordnen.

Kann aufgrund einer bekannten Erkrankung des Spenders davon ausgegangen werden, dass virale Erreger abgegeben werden, so sind die primären Zellen oder Körperflüssigkeiten in die Risikogruppe des erwarteten Virus einzustufen.

Ungeachtet der Zuordnung zu der oben genannten Risikogruppe wird die Einhaltung der persönlichen Sicherheitsmassnahmen der Sicherheitsstufe 2 empfohlen.

1.4.2.) Nicht humane Primatenzellen:

Grundsätzliche Risikobewertung bei der Verwendung von primären Zellen aus Primaten (außer Menschen):

Da Intraspecies-übertragbare Viren bei Primaten weit verbreitet sind, ist auch bei Zellmaterial von Primaten aus kontrollierten Zuchten eine Einstufung in die Risikogruppe 2 vorzunehmen.

Bei der Verwendung von Zellmaterial aus Wildfängen ist die Risikobewertung „case by case“ durchzuführen. Dabei ist aber mindestens von einer Einstufung in die Risikogruppe 2 auszugehen.

1.4.3.) Vertebratenzellen (außer Primaten):

Grundsätzliche Risikobewertung bei der Verwendung von primären Zellen aus Vertebraten (außer Primaten):

Primäre Zellen von *Chiroptera* (Flattertiere), bei denen die Anwesenheit von Rabies-Viren nicht ausgeschlossen werden kann, sind der Risikogruppe 2 zuzuordnen.

Primäre Zellen aus *Chiroptera*, bei denen die Abwesenheit von Rabies-Viren nachgewiesen ist, sowie andere primäre Zellen aus Vertebraten (außer Primaten) können in die Risikogruppe 1 eingeordnet werden, wenn bei den Tieren keine Krankheitssymptome erkennbar sind und diese Tiere aus veterinärmedizinisch überprüften Beständen stammen. Besteht jedoch ein begründeter Verdacht, dass bei einem gesund erscheinenden Spender virale Zoonose-Erreger im primären Gewebe vorliegen, so sind die primären Zellen entsprechend der Risikogruppe des Erregers einzustufen.

2.) Listen zur Einstufung etablierter Zelllinien in Risikogruppen:

Die im Folgenden aufgelisteten Institutionen bieten im Internet Informationen und Einstufungen in Risikogruppen für etablierte Zelllinien an. Die Weblinks werden auf der Website „Gentechnik“ des Bundesministeriums für Gesundheit, Familie und Jugend (www.gentechnik.gv.at) veröffentlicht. Diese Listen und Informationen werden auch von der Gentechnikabteilung dieses Ministeriums zur Risikobewertung herangezogen.

2.1) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ):

Die DSMZ bietet zu jeder Zelllinie ausführliche Informationen über die Eigenschaften der jeweiligen Zelllinie an. Bei Zelllinien, die in eine Risikogruppe höher als 1 eingeordnet werden, ist auch die Risikogruppe angegeben.

2.2.) American Type Culture Collection (ATCC):

In den „Product Descriptions“ der ATCC wird die Risikogruppe der betreffenden Zelllinie explizit angegeben.

2.3.) Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit (ZKBS, D):

Die ZKBS bietet ebenfalls eine Liste mit Zelllinien, deren Einstufung in Risikogruppe sowie weiteren Informationen an.

2.4) Unterschiede in der Risikobewertung zwischen ATCC und ZKBS:

In einigen wenigen speziellen Fällen unterscheidet sich die Einstufung der ZKBS von der die im ATCC Katalog getroffen wird. **Konkret sind davon die Zelllinien HEK293 (293), COS-1, COS-7 und Raji betroffen.** Diese Zelllinien werden von der ATCC in die Risikogruppe 2 eingestuft. In einer allgemeinen Stellungnahme der ZKBS (Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung der Empfängerzelllinien COS, 293 und Raji) werden diese Zelllinien allerdings in die Risikogruppe 1 eingestuft. Diese Einstufung durch die ZKBS kann auch für Österreich akzeptiert werden.

Wesentlicher Inhalt dieser Stellungnahme:

I. COS-1- und COS-7-Zelllinie:

Die Etablierung von COS-Zelllinien wurde 1981 publiziert. Dabei wurde eine CV-1-Zelllinie, eine etablierte Nierenzelle von Grünen Meerkatzen, die für die Vermehrung des SV40-Virus permissiv ist, mit einer SV40-Mutante transfiziert, die eine Deletion von 6 bp im Replikationsursprung aufweist und somit nicht mehr replikationsfähig ist. Als Kontrolle wurde Wildtyp-SV40-DNA transfiziert. Die mit Wildtyp-DNA transfizierten CV-1-Zellen lysierten durch die virale Replikation nach ca. 6 Wochen. Bei der Transfektion mit den Mutanten bildeten sich 3 Zellpopulationen (COS-1, -3 und -7), wovon COS-1 genauer analysiert wurde. COS-1 enthält 2 Kopien defekter Genome der SV-40-Mutante, welche im Wirtsgenom integriert vorliegen. Eine Kopie enthält die komplette frühe Region und einen Teil der späten (nur VP2), die zweite Kopie enthält nur die späten Gene VP1 und VP2.

Die COS-1 und COS-7 Zelllinie wird daher in die Risikogruppe 1 eingeordnet. In Verbindung mit Vektoren, die den Replikationsursprung von SV40, aber keine späten SV40-Gene, oder die späten SV40-Gene, aber keinen funktionsfähigen SV40-Replikationsursprung enthalten, handelt es sich um anerkannte biologische Sicherheitsmaßnahmen.

Begründung:

COS-1- und COS-7-Zelllinien befinden sich in vielen molekularbiologisch arbeitenden Labors seit langem in Gebrauch. Bei einer Reversion der integrierten SV40-Mutante zum Wildtyp würde diese Zelllinie durch die lytische Vermehrung von Wildtyp-SV40 lysieren. Eine spontan auftretende Lyse wurde nicht beobachtet. Es ist somit davon auszugehen, dass die Deletion im SV40-Replikationsursprung bei den SV40-Mutanten in den COS-Zellen stabil ist. In COS-1-Zellen sind die Genome der SV40-Mutante noch durch zusätzliche Deletionen gekennzeichnet. COS-Zellen entsprechen somit etablierten Affennierenzellen, die defekte virale Genome enthalten und keine infektiösen Viruspartikel abgeben.

II. 293-Zelllinie:

Die Etablierung der Zelllinie 293 wurde 1977 publiziert. Dabei wurden menschliche embryonale Nierenzellen (HEK) mittels Scherkraft fragmentierter DNA von Adenovirus Typ 5 transformiert. Die durch die Scherung erzielte durchschnittliche Größe von DNA-Fragmenten betrug ein Drittel des viralen Genoms. Eine der wenigen dabei erhaltenen transformierten Zellklone führte zur Etablierung der 293-Zelllinie. Die DNA-Analyse ergab, dass 4 – 5 Kopien vom linken Ende (12% des viralen Genoms, E1a,b-Gene) und 1 Kopie vom rechten Ende (10%, E4-Gen) in 293-Zellen vorhanden sind. Die RNA-Analyse zeigte, dass das linke Ende transkriptionell aktiv ist.

In Verbindung mit Vektoren, die nicht die späten adenoviralen Gene enthalten handelt es sich um eine anerkannte biologische Sicherheitsmaßnahme.

Begründung:

Die 293-Zelllinie befindet sich bei vielen molekularbiologisch arbeitenden Labors seit langem in Gebrauch. Hätten die transfizierten adenoviralen Genomabschnitte zu einem vollständigen viralen Genom rekombiniert, wären die Zellen durch die Vermehrung der Adenoviren lysiert und eine Zelllinie

hätte sich nicht etablieren können. Eine spontan auftretende Lyse der etablierten Zelllinie wurde auch nicht beobachtet. Die DNA-Fragmente des Adenovirus liegen im Genom der Zelllinie stabil integriert vor. Es konnten keine viralen DNA-Fragmente des mittleren genomischen Bereichs identifiziert werden, die für späte virale Proteine kodieren. Transkripte wurden nur vom linken adenoviralen Genomende, welches die transformierende Region enthält, nachgewiesen. Die 293-Zelllinie entspricht somit einer etablierten menschlichen Zelllinie, die Teile eines viralen Genoms enthält und keine infektiösen Viruspartikel abgibt.

III. Raji-Zelllinie:

Die Etablierung der Raji-Zelllinie wurde 1964 publiziert. Sie wurde aus einem Burkitt Lymphom eines 11-jährigen Jungen angelegt. Durch elektronenmikroskopische Analyse konnten keine Viruspartikel identifiziert werden. Die molekularbiologische Analyse ergab, dass in der Raji-Zelllinie latente Epstein-Barr-Virus (EBV)-Genome vorliegen, welche zwei Deletionen an unterschiedlichen Stellen im Genom enthalten. Eine dieser Deletionen betrifft ein für die lytische Replikation essentielles Gen. Selbst eine Behandlung mit TPA, die bei anderen Zelllinien, die latentes EBV enthalten, die Abgabe infektiöser EBV bewirkt, führt bei der Raji-Zelllinie weder zu einer Erhöhung der Replikationsrate der EBV-DNA noch zur Herstellung infektiöser EBV.

In Verbindung mit Vektoren, die nicht die in der Raji-Zelllinie deletierten EBV-DNA-Fragmente enthalten, handelt es sich um eine anerkannte biologische Sicherheitsmaßnahme.

Begründung:

Die Raji-Zelllinie befindet sich bei vielen molekularbiologisch arbeitenden Labors seit langem in Gebrauch. Virale Partikel oder vollständige virale Genome konnten nicht identifiziert werden. Die Raji-Zelllinie entspricht somit einer etablierten menschlichen Zelllinie, die Teile eines viralen Genoms enthält und keine infektiösen Viruspartikel abgibt.

Ein weiteres Beispiel für die unterschiedliche Einstufung zwischen der ATCC und der ZKBS stellt die Zelllinie CaSki dar. Diese Zelllinie ist nach den Angaben des ATCC Katalogs in die Risikogruppe 2 eingeordnet. In einer allgemeinen Stellungnahme der ZKBS (Stellungnahme der ZKBS zur Zelllinie CaSki) wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Kulturbedingungen der Zelllinie CaSki für die Entstehung von Virus-Partikeln relevant sind. Wenn die CaSki Zelllinie als Monolayer-Kultur gehalten wird, ist nicht von der Entstehung und Abgabe viraler Partikel auszugehen. Sie kann daher als Empfängerorganismus bei Arbeiten mit GVO im geschlossenen System der Risikogruppe 1 zugeordnet werden.

Bei allen anderen Kulturbedingungen wird diese Zelllinie allerdings sowohl als Spender- als auch als Empfängerorganismus der Risikogruppe 2 zugeordnet.